

Expression des „activated leukocyte cell adhesion molecule“ im Mammakarzinom

Prädiktivität für das Ansprechen auf eine taxanfreie Chemotherapie

Das invasive Karzinom der Brustdrüse ist in den meisten Industrieländern die zweithäufigste Todesursache der Frau [1]. Eine Senkung der Mortalitätsrate wird über einen wachsenden Aufwand der Früherkennung und durch Verbesserung der postchirurgischen Therapie angestrebt. Die Modalität der postchirurgischen Therapie ist in hohem Maß vom pathologischen Befund mit Abschätzung der Aggressivität des Karzinoms durch die Bestimmung des Tumortyps, des TNM-Stadiums (T: „tumor“, N: „node“, M: „metastasis“) und des histologischen Differenzierungsgrades abhängig. Neben diesen rein prognostischen Parametern hat die Bestimmung des Hormonrezeptor- und des Her2/neu-Status zudem eine prädiktive Aussage im Hinblick auf eine antiöstrogene Therapie bzw. Trastuzumab- (Herceptin-)Therapie. Andere Marker, die mit der Prognose der Tumorerkrankung korrelieren, aber keinen prädiktiven Wert besitzen, wurden beschrieben [2]. Es besteht also Bedarf an weiteren prädiktiven Parametern für die alltägliche klinische Arbeit.

Karzinomzellen zeichnen sich u. a. dadurch aus, dass ihre interzelluläre Verbindung herabgesetzt ist. In den zahlreichen Schritten von der Entartung der Zelle bis hin zur manifesten Metastasenbildung spielen die Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle [3]. Diese können in die Familie der Selektine, Integrine, Cadherine und der Zelladhäsionsmoleküle der Immunoglobulinsuperfamilie (Ig-CAM) unterteilt werden. „Activated leukocyte cell adhesion molecule“ (ALCAM), auch bekannt als CD166 oder „melanoma-metastasizing clone D“ (MEMD), ist ein Glykoprotein der Ig-CAM mit einem Molekulargewicht (MG) von ca. 105.000, das auf Chromosomen 3 (3q13.1–q13.2) kodiert ist. Es besitzt 5 extrazelluläre Immunglobulin-domänen [2 NH₂-terminale variable (V)-typische „loops“ und 3 membranproximale konstante (C)-typische „loops“], eine transmembranäre Region und ein kurzes, zytoplasmatisches Ende [4]. Die ALCAM-Moleküle können untereinander sog. homotypische und mit CD6 – einem lymphozytären Oberflächenmarker – heterotypische Bindungen eingehen. Activated leukocyte cell adhesion molecule wird physiologisch in unterschiedlichen Organen und Zellen wie z. B. in aktivierten Leukozyten, mesenchymalen und häma-

topoetischen Stammzellen exprimiert [5]. An Tumoren wurde eine Expression von ALCAM in der Infiltrationszone zunächst beim malignen Melanom gezeigt [9]. Auch andere Arbeiten konnten einen Zusammenhang zwischen hoher ALCAM-Expression und schlechter Prognose zeigen, sodass eine funktionelle Bedeutung von ALCAM in der Tumorgenese und -progression vermutet wurde.

Material und Methoden

Patientenkollektiv

Primäre Mammakarzinomgewebe von 162 Patientinnen wurden für Western-Blot- (WB-) und Microarray-Analysen aufgearbeitet. Alle Patientinnen waren wegen der Mammakarzinomkrankung am Universitätsklinikum Hamburg zwischen 1992 und 2002 in Behandlung. Der mittlere Nachbeobachtungszeitraum betrug 84 Monate (8–169 Monate). Brust-erhaltende Operationen wurden an 53% der Frauen durchgeführt. Es erhielten 87 Patientinnen eine taxanfreie adjuvante Chemotherapie:

- Epirubicin/Cyclophosphamid (E/C): 37 Patientinnen,

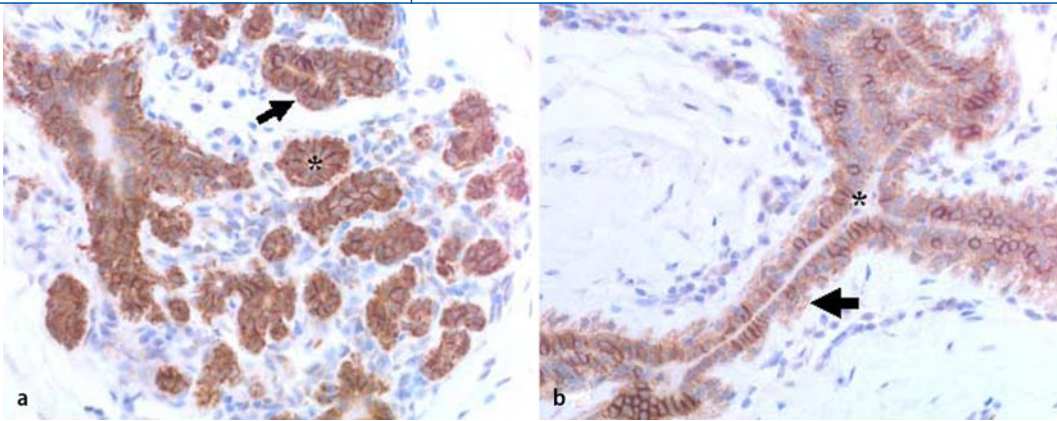


Abb. 1 ▲ Immunhistochemische Darstellung von ALCAM. **a** In den terminalen duktulolobulären Einheiten sind durchgehend alle luminalen (Asterix) und basalen (Pfeil) Epithelzellen kräftig membranös positiv für ALCAM. **b** In den Drüsengängen sind die luminalen (Asterix) Epithelzellen für ALCAM unterschiedlich intensiv membranös markiert. Die basalen (Pfeil) Epithelzellen weisen eine zytoplasmatische Anfärbung, nicht aber eine eindeutige membranöse Anfärbung auf. (Vergr. 200:1)

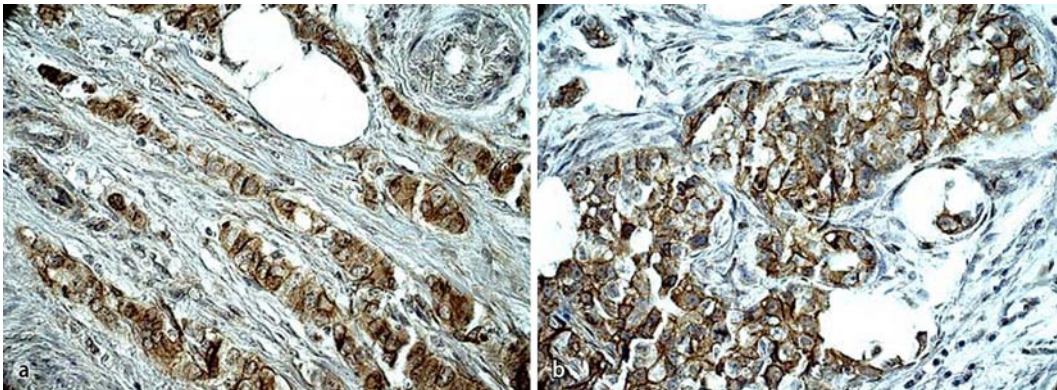


Abb. 2 ▲ Immunhistochemische ALCAM-Expression in invasiven Mammakarzinomen. In den meisten Tumorzellen des invasiv-lobulären **a** und des invasiv-duktales **b** Mammakarzinoms wird ALCAM kräftig membranös exprimiert. (Vergr. 320:1)

- Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluoruracil (CMF): 44 Patientinnen,
- Epirubicin (E) oder 5-Fluoruracil/Epirubicin/Cyclophosphamid (FEC): 3 Patientinnen und
- unbekanntes Therapieschema: 3 Patientinnen.

Immunhistochemie und Western-Blot-Analysen

Immunhistologische Untersuchungen wurden an 4 µm dicken, in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben mit dem monoklonalen Antikörper NCL-CD166 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) in einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt.

Schockgefrorenes, in Flüssigstickstoff gelagertes Tumorbankgewebe wurde mit einem Mikrodismembrator (Braun-Mel-

sungen, Melsungen) pulverisiert, in tritonhaltigem Puffer inkubiert und anschließend für 1 h bei 25.000 rpm zentrifugiert. Der Proteingehalt im Überstand wurde mit einem „Bicinchoninic-acid“- (BCA-)Protein-Assay ermittelt. Western-Blot-Analysen wurden, wie beschrieben [7], unter Verwendung von 20 µg Protein/Spur in einem 8%igen Polyacrylamidgel durchgeführt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) übertragen und für 1 h mit dem NCL-CD166-Antikörper in einer Verdünnung 1:400 inkubiert. Die Proteinmengen in den Banden wurden densitometrisch relativ zu einer Kontrollzelllinie bestimmt (GS-700 Imaging Densitometer, BioRad, München).

Microarray-Analysen

Ribonukleinsäure (RNA) wurde mithilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Zur Quantifizierung der Transkripte wurden Affymetrix (Santa Clara, CA), HG-U133A Arrays und GeneChip System™ nach Instruktionen der Hersteller verwendet. Proben mit suboptimalen Signalen wurden auf einem neuen Array erneut markiert und hybridisiert.

Ergebnisse

ALCAM-Expression in der Immunhistologie

Activated leukocyte cell adhesion molecule wird in nichtneoplastischen Brustdrüsen exprimiert. Innerhalb der terminalen duktulolobulären Einheiten (TDLU) ist eine kräftige membranöse Expression in

den luminalen Epithelzellen nachweisbar. Weniger kräftig, aber ebenfalls durchgehend sind die basalen Epithelzellen (Myoepithelzellen) der TDLU markiert. In den Drüsengängen ist die Mehrzahl der luminalen Epithelzellen mit unterschiedlicher Intensität ALCAM-positiv, während die basalen Epithelzellen granulär zytoplasmatisch, nicht aber eindeutig membranös markiert sind (■ **Abb. 1**). Das invasiv-lobuläre Mammakarzinom ist durch sein dissolutes Wachstum gekennzeichnet. Die fehlende bzw. deutlich reduzierte Zellkohäsion ist auf das Fehlen des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin zurückzuführen. In der immunhistologischen Untersuchung (IHC) ist in kein Unterschied in der membranösen Markierung zwischen den invasiv-lobulären (klassische Variante) und den invasiv-duktalem (NOS) Mammakarzinomen zu erkennen (■ **Abb. 2**).

Western-Blot-Analysen

Die immunhistochemische Farbreaktion ist von zahlreichen Faktoren wie z. B. Fixierungsdauer, Präparatgröße und Art des Gewebes abhängig. Diese Umstände machen die immunhistochemische Quantifizierung für viele Antikörper unzuverlässig. Daher wurden die quantitativen Analysen für ALCAM-Proteine mithilfe der WB-Analysen und für ALCAM-mRNA mithilfe der Microarray-Analysen (Affymetrix) durchgeführt. Die WB-Analysen ergaben für ALCAM eine spezifische Bande von MG 90.000–110.000. Die große Bandenbreite ist auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen. Die durchschnittliche, mit der Densitometrie bestimmte Proteinmenge betrug 125,9% (bezogen auf eine Kontrollzelllinie; Daten nicht abgebildet).

Microarrays

Die Quantifizierungen der ALCAM-Transkriptmenge in 162 Mammakarzinomen wurden mithilfe der Microarray-Analysen (Affymetrix) durchgeführt. Die relativen Transkriptmengen reichten von 187–11.150 mit einem Mittelwert von 2548. Von 133 Mammakarzinomen konnten sowohl quantitative Protein- als auch RNA-Werte bestimmt werden, die signifikant

Pathologe 2008 · [Suppl 2] 29:347–352 DOI 10.1007/s00292-008-1080-5
© Springer Medizin Verlag 2008

E. Kilic · K. Milde-Langosch · V. Müller · R. Wirtz · M. Ihnen

Expression des „activated leukocyte cell adhesion molecule“ im Mammakarzinom. Prädiktivität für das Ansprechen auf eine taxanfreie Chemotherapie

Zusammenfassung

Ziele. „Activated leukocyte cell adhesion molecule“ (ALCAM) ist ein Oberflächenimmunglobulin und wird in vielen Mammakarzinomen exprimiert. Es wird vermutet, dass ALCAM in der Tumorgenese und -progression eine Rolle spielt. Die Bedeutung des Adhäsionsmoleküls ALCAM für das Ansprechen auf eine taxanfreie adjuvante Chemotherapie wurde untersucht.

Material und Methoden. Gewebeproben von 162 Patientinnen mit Mammakarzinomen wurden im Hinblick auf die Expression des ALCAM-Proteins untersucht. Immunhistologische Untersuchungen (IHC) und Western-Blot-Analysen (WB) wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen ALCAM durchgeführt. Die Proteinmengen im WB wurden densitometrisch quantifiziert und mit klinischen sowie histologischen Parametern korreliert. Die Ergebnisse wurden auf mRNA-Ebene mithilfe der Microarray-Analysen (Affymetrix) validiert.

Ergebnisse. In der normalen Brustdrüse wird ALCAM in den luminalen und den basalen Epithelzellen exprimiert. Die WB-Analysen von Mammakarzinomen zeigen eine positive Korrelation der ALCAM-Expression mit dem Östrogenrezeptorstatus ($p=0,04$). Bei Patientinnen, die eine taxanfreie Chemotherapie erhalten haben, ist eine hohe ALCAM-Expression (WB, Affymetrix) prädiktiv für das Ansprechen einer Chemotherapie. Der mediane mRNA-Level von ALCAM war bei Patientinnen, die während des Beobachtungszeitraums noch lebten, 4,5-fach höher als bei Patientinnen, die verstarben.

Schlussfolgerung. Ein hoher ALCAM-Gehalt korreliert positiv mit dem Östrogenrezeptorstatus. Außerdem ist ALCAM ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen einer taxanfreien Chemotherapie.

Schlüsselwörter

ALCAM · Adhäsionsmolekül · Mammakarzinom · Prädiktionsmarker · Chemotherapie

Expression of activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer. Predictability of the response to taxane-free chemotherapy

Abstract

Aims. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) is a cell surface immunoglobulin expressed in breast cancer (BC) and is assumed to be implicated in tumorigenesis and tumour progression. The importance of the adhesion molecule ALCAM for the response to taxane-free adjuvant chemotherapy was investigated.

Materials and methods. Tissue specimens from 162 primary breast cancer patients were analyzed. Immunohistochemical staining (IHC) and Western blots (WB) were performed using monoclonal antibody against ALCAM. Relative protein amounts in WB bands were determined densitometrically. ALCAM mRNA expression was evaluated by microarray analysis (Affymetrix).

Results. In the normal breast ALCAM is expressed in luminal and basal epithelial cells.

In BC samples, WB analysis showed a significant positive correlation of ALCAM levels with estrogen receptor status ($p=0.04$). For patients who received a taxane-free chemotherapy, a high ALCAM expression was predictive for a good response to chemotherapy. Median mRNA expression of ALCAM was 4.5-fold higher in patients alive at the time of follow-up compared to those who died of breast cancer.

Conclusions. Higher ALCAM expression showed a positive correlation with estrogen receptor status and is a useful predictive marker for the response to taxane-free chemotherapy.

Keywords

ALCAM · Adhesion molecule · Breast cancer · Predictive factor · Chemotherapy

Tab. 1 Korrelation der ALCAM-Expression mit B.R.E.-Grad und Östrogenrezeptorstatus

ALCAM-Protein-Analyse					
	n	Leicht (n=51)	Mäßig (n=51)	Hoch (n=52)	
B.R.E.-Grad					
Grad 1–2	88	25	36	27	p=0,057
Grad 3	66	26	15	25	
Östrogenrezeptor (ER)					
ER-positiv	112	30	42	40	p=0,025
ER-negativ	38	19	8	11	
ALCAM-mRNA-Analyse					
	n	Leicht (n=52)	Mäßig (n=54)	Hoch (n=53)	
B.R.E.-Grad					
Grad 1–2	77	20	25	32	p=0,074
Grad 3	82	32	29	21	
Östrogenrezeptor (ER)					
ER-positiv	114	33	40	41	n.s.
ER-negativ	40	17	11	12	
ALCAM, „activated leukocyte cell adhesion molecule“ B.R.E.-Grad Bloom-Richardson-Ellis-Grad.					

ALCAM „activated leukocyte cell adhesion molecule“, B.R.E.-Grad Bloom-Richardson-Ellis-Grad.

Tab. 2 Cox-Regressionsanalyse unter Einschluss der konventionellen Prognosemarker und der ALCAM-Expression auf mRNA-Ebene

Marker	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	p
<i>Krankheitsfreier Verlauf (DFI)</i>			
ALCAM	0,308	0,111–0,852	0,023
ER	0,463	0,223–0,962	0,039
pN	2,335	1,108–4,919	0,026
pT	1,271	0,749–2,159	0,374
B.R.E.-Grad	1,963	0,853–4,503	0,113
<i>Gesamtüberleben (OS)</i>			
ALCAM	0,092	0,023–0,367	0,001
ER	0,344	0,135–0,873	0,025
pN	2,169	0,828–5,683	0,115
pT	1,874	0,986–3,560	0,055
B.R.E.-Grad	1,349	0,531–3,427	0,529

ALCAM „activated leukocyte cell adhesion molecule“, B.R.E. Bloom, Richardson, Ellis, DFI „disease-free interval“, ER „estrogen receptor“, OS „overall survival“, pN „pathologic nodal status“, pT „pathologic tumor stage“.

Univariate Analyse des Krankheitsverlaufs

Zur Untersuchung der prädiktiven und prognostischen Bedeutung von ALCAM wurde die Kohorte in eine Gruppe mit hohem und eine Gruppe mit fehlendem/niedrigem ALCAM-Gehalt entsprechend der Protein- bzw. mRNA-Menge unterteilt. Im Gesamtkollektiv ergaben die Kaplan-Meier-Analysen für die Gruppe mit hohem ALCAM-Gehalt einen leichten, nichtsignifikanten Vorteil bezüglich des krankheitsfreien Verlaufs („disease-free interval“, DFI) und des Gesamtüberlebens („overall survival“, OS). Stratifiziert man jedoch die Patientinnen in solche, die eine taxanfreie adjuvante Chemotherapie erhalten haben, und solche, die keine Chemotherapie, sondern nur eine endokrine Therapie oder Strahlentherapie erhalten haben, ergeben sich signifikante Unterschiede in der Prognose in Abhängigkeit von ALCAM. Chemotherapierte Patientinnen mit hohem ALCAM-mRNA-Gehalt haben ein längeres DFI (p=0,054) und ein signifikant längeres OS (p=0,0012) im Vergleich zu Patientinnen mit niedrigem/fehlendem ALCAM-mRNA-Gehalt (■ **Abb. 3**). Nach 10 Jahren leben 93% der Patientinnen mit hoher mRNA-Expression und 67% der Patientinnen mit niedriger/fehlender mRNA-Expression. Hohe Proteinexpression ist in der Gruppe mit Chemotherapie tendenziell mit längerem DFI (p=0,201) und OS (p=0,071) korreliert, erreicht aber nicht die Signifikanzgrenze.

Multivariate Analyse des Krankheitsverlaufes

Die Bedeutung des ALCAM-mRNA-Niveaus in der Prädiktion für das Ansprechen auf eine adjuvante taxanfreie Chemotherapie wurde in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse unter Einschluss des B.R.E.-Grades, des TNM-Stadiums und des Hormonrezeptorstatus untersucht. In diesem Modell sind ein hoher ALCAM-mRNA-Gehalt, ein positiver ER-Status und ein nodalnegatives Stadium univariate Prädiktoren für ein langes DFI und OS (■ **Tab. 2**). Für das OS ist die ALCAM-Expression der strengste prädiktive Faktor von den untersuchten Parametern

miteinander korrelierten (p<0,0001; Daten nicht abgebildet).

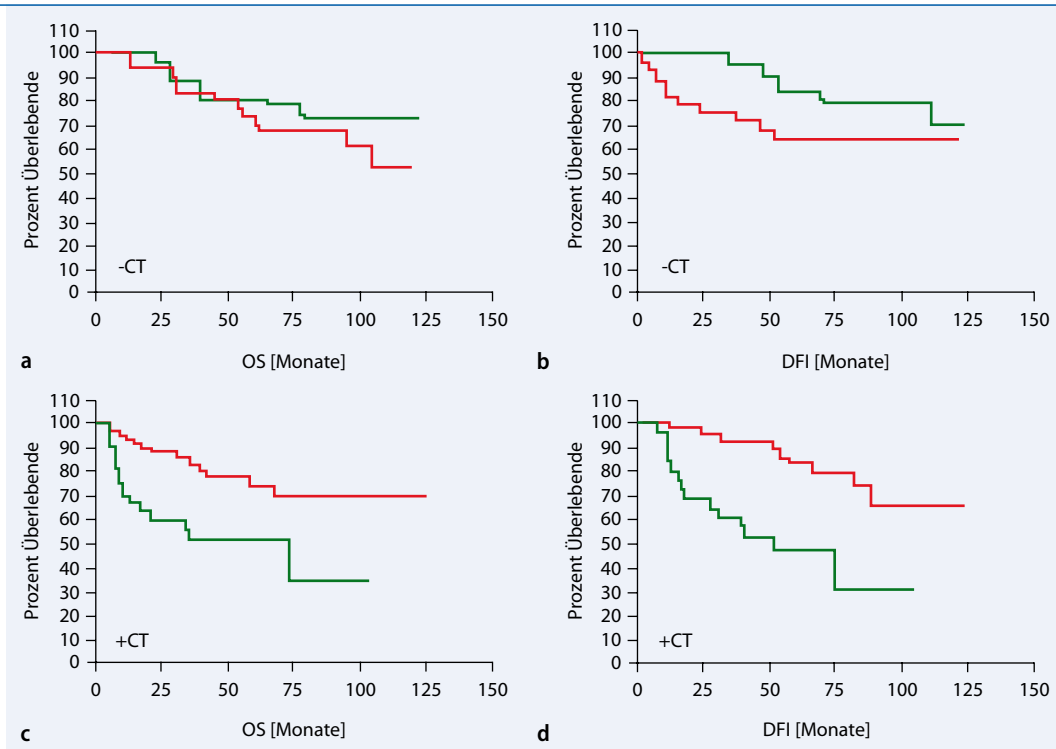
Korrelation ALCAM mit ER-Status, B.R.E.-Grad

Für statistische Analysen wurden die Patientinnen in 3 etwa gleich große Gruppen entsprechend ihrem ALCAM-Protein- bzw. -ALCAM-mRNA-Gehalt (niedrig, mäßig, hoch) unterteilt.

Weder der Protein- noch der mRNA-Gehalt korrelierten signifikant mit dem Lebensalter der Patientinnen, dem histologischen Tumortyp oder dem TNM-Stadium, einschließlich des Nodalstatus

im χ^2 -Test. Eine tendenzielle, aber statistisch nichtsignifikante Korrelation besteht zwischen dem histologischen Differenzierungsgrad nach Bloom-Richardson-Ellis (B.R.E.) und der ALCAM-Expression auf Protein- (p=0,057) sowie mRNA-Ebene (p=0,074), mit niedrigerer ALCAM-Expression in schlechter differenzierten Tumoren (■ **Tab. 1**). Die ALCAM-Proteinmenge in den WB-Analysen korrelierte signifikant positiv mit dem Östrogenrezeptor- („Estrogen-receptor“, ER-)Status, nicht aber mit dem Progesteronrezeptor- (PR-)Status.

Abb. 3 ▶ Prädiktiver Wert des ALCAM-mRNA-Gehalts für das Ansprechen auf eine taxanfreie adjuvante Chemotherapie in der Kaplan-Meier-Analyse. Rote Linie hoher ALCAM-Level, grüne Linie niedriger ALCAM-Level. (a, b; n=62) **a** Gesamtüberleben (OS) und **b** krankheitsfreier Verlauf (DFI) der Patientinnen behandelt mit nur endokriner Therapie oder Strahlentherapie. (c, d; n=100) **c** OS und **d** DFI der Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie



($p=0,001$). In der multivariaten Analyse behält neben ALCAM nur noch der ER-Status seine Signifikanz als prognostischer Parameter, während das T- und N-Stadium eine deutliche Tendenz zeigen, die Signifikanzgrenze aber verfehlen.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Expression von ALCAM insbesondere auf der mRNA-Ebene ein geeigneter Marker für die Prädiktion des Ansprechens auf eine taxanfreie Chemotherapie beim invasiven Mammakarzinom sein könnte.

Activated leukocyte cell adhesion molecule wird in normalen Drüsenepithelien der Brustdrüse – in den luminalen stärker als in den basalen Epithelzellen – membranös exprimiert. Eine kräftige Expression von ALCAM in Brustdrüsenepithelien wurde auch von King et al. mit der IHC gezeigt [6], hingegen konnten Burkhardt et al. [8] nur eine schwache Expression nachweisen. Auch die Datenlage für maligne Tumoren ist widersprüchlich. Die ersten klinisch-pathologischen Studien zu ALCAM wurden an Melanomen durchgeführt. Kempen et al. [9] konnten in immunhistologischen Studien zeigen, dass die ALCAM-Expression mit der Progression von malignen Melanomen korre-

liert und dass die meisten melanozytären Nävi und malignen Melanome im Stadium Clark-Level 1 und 2 negativ für ALCAM sind. Eine erhöhte Expression von ALCAM an der Invasionsfront wie bei den malignen Melanomen wurde in dieser Studie beim Mammakarzinom nur in Einzelfällen beobachtet. Eine Beziehung der Herunterregulation von ALCAM mit schlechtem Differenzierungsgrad wurde beim Prostatakarzinom [10] und eine Korrelation mit fortgeschrittenem Tumorstadium sowie schlechter Prognose beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [11] beschrieben. Hingegen wurde beim kolorektalen Karzinom [12] und beim Urothelkarzinom [13] eine negative Korrelation zwischen der ALCAM-Expression und der Prognose gezeigt. Auch für Mammakarzinome sind die Ergebnisse uneinheitlich. Im Gegensatz zu anderen Studien mit kleinen Fallzahlen konnte an der hier vorgestellten Kohorte weder auf der Protein- noch auf der mRNA-Ebene eine signifikante Korrelation mit dem histologischen Typ, dem Differenzierungsgrad, dem TNM-Stadium und dem PR-Status gezeigt werden [6, 14]. Wie in der Untersuchung von Jezierska et al. [14] konnte auch hier eine positive Korrelation der ALCAM-Proteinexpression mit dem ER-Status nachgewiesen werden. Interes-

santerweise werden die Expression von ALCAM und das Überleben von Mammakarzinomzelllinien durch die Gabe von 17β -Östradiol gesteigert und durch Tamoxifen inhibiert [15]. Von den Autoren wurde geschlussfolgert, dass eine hohe ALCAM-Expression die Zellen vor Apoptose schützt.

Fazit

In der hier vorgestellten Studie konnte bei Berücksichtigung aller Patientinnen keine Korrelation der ALCAM-Expression mit dem DFI oder OS gefunden werden. In der Subgruppenanalyse nach Stratifizierung der Patientinnen in eine Gruppe ohne Chemotherapie und eine Gruppe mit taxanfreier Chemotherapie konnte jedoch ein deutlicher Unterschied gezeigt werden: Sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse war der ALCAM-Gehalt auf Protein- und mRNA-Ebene der strengste Parameter für ein langes DFI und OS nach adjuvanter Chemotherapie. In den bislang publizierten Studien wurde die ALCAM-Expression auf ihren prognostischen, nicht aber prädiktiven Wert hin untersucht. Von diesen Autoren wurden allerdings keine oder nur unvollständige Informationen bezüglich der Therapien

mitgeteilt; dies erklärt möglicherweise die Unterschiede in den Ergebnissen der jeweiligen Studien.

Hohe ALCAM-Expression korreliert positiv mit dem ER-Status und ist ein möglicher prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine taxanfreie Chemotherapie.

Korrespondenzadresse

Dr. E. Kilic

Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel
Schönbeinstraße 40, 4003 Basel-Stadt, Schweiz
ekilic@uhbs.ch

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Rampaul RS, Pinder SE, Elston SE et al., Nottingham Breast Team (2001) Prognostic and predictive factors in primary breast cancer and their role in patient management: the Nottingham breast team. *Eur J Surg Oncol* 27: 229–238
2. Thomssen C, Jänicke F, Harbeck N (2003) Clinical relevance of factors in axillary node-negative breast cancer. *Onkologie* 26: 438–445
3. McSherry EA, Donatello S, Hopkins AM, McDonnell S (2007) Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 64: 3201–3218
4. Swart GW (2002) Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 81: 313–321
5. Ohneda O, Ohneda K, Arai F et al. (2001) ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 98: 2134–2142
6. King JA, Ofori-Acquah SF, Stevens T et al. (2004) Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res* 6: R478–R487
7. Bamberger AM, Methner C, Lisboa BW et al. (1999) Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int J Cancer* 84: 533–538
8. Burkhardt M, Mayordomo E, Winzer KJ et al. (2006) Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer. *J Clin Pathol* 59: 403–409
9. Kempen LC van, Oord JJ van den, Muijen GN van et al. (2000) Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 156: 769–774
10. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C et al. (2005) Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol* 205: 359–376
11. Verma A, Shukla NK, Deo SV et al. (2005) MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 68: 462–470
12. Weichert W, Knösel T, Bellach J et al. (2004) ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* 57: 1160–1164
13. Tomita K, Bokhoven A van, Jansen CF et al. (2000) Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 870–874
14. Jezierska A, Olszewski WP, Pietruszkiewicz J et al. (2006) Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) is associated with suppression of breast cancer cells invasion. *Med Sci Monit* 12: BR245–BR256
15. Jezierska A, Matysiak W, Motyl T (2006) ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy. *Med Sci Monit* 12: BR263–BR273